

**Re: Application No. 10/588,323
Magilavy et al.
Information Disclosure Statement
filed August 31, 2007**

**Cited References
B21 - B30**

DNA sequences, recombinant DNA molecules and processes for producing lymphocyte function associated antigen-3

Publication number: JP2501113T

Publication date: 1990-04-19

Inventor:

Applicant:

Classification:

- international: G01N33/53; C07H21/04; C07K14/00; C07K14/435; C07K14/705; C12N1/00; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09; C12P21/02; G01N33/569; A61K38/00; C12R1/19; C12R1/91; G01N33/53; C07H21/00; C07K14/00; C07K14/435; C12N1/00; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/09; C12P21/02; G01N33/569; A61K38/00; (IPC1-7): C07H21/04; C07K13/00; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/12; C12P21/02; G01N33/53

- european: C07K14/705B22; G01N33/569H2

Application number: JP19880505208 19880603

Priority number(s): US19870057615 19870603

Also published as:

WO8809820 (A1)
EP0315683 (A1)
US4956281 (A1)
HU211627 (A9)
EP0315683 (A4)

[more >>](#)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP2501113T

Abstract of corresponding document: [US4956281](#)

Polypeptides that bind to CD2, the receptor on the surface of T-lymphocytes. Most preferably, the polypeptides bind to CD2 on the surface of T-lymphocytes and inhibit adhesion between T-lymphocytes and target cells. DNA sequences that code on expression in appropriate unicellular hosts for those polypeptides. Methods of making and using those polypeptides in therapy and diagnosis.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

④日本国特許庁(JP)

①特許出願番号

②公表特許公報(A)

平2-5(

③公表 平成2年(1990)

④Int. CL³

C 12 N 15/12
C 07 H 21/04
C 07 K 13/00

識別記号

ZNA

序内整理番号

8318-4H*

審査請求 未請求

予備審査請求 未請求

部門(区分)

(全)

⑤発明の名称 DNA配列、組換DNA分子及びリソバ球根能・結合した抗原-3の製造方法

⑥特開 昭63-505208

⑦公出 昭63(1988)6月3日

⑧翻訳文提出日 平1(1989)2月2

⑨国際出願 PCT/US88/01624

⑩国際公開番号 WO88/09820

⑪国際公開日 昭63(1988)12月15

⑫優先権主張 ⑬1987年6月3日⑭米国(US)⑮957,615

⑬発明者 ウォルナー, ハーバラ ピー アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02139、ケンブリッジ
ターミストリート?

⑭出願人 バイオジエン インコーポレイテッド アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02142、ケンブリッジ
ターミストリート?

⑮代理人 浜田 治雄

⑯代碼人 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FR(広域特許),
(特許), HU, IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許), US

最終頁に継ぐ

請求の範囲:

1. (a) ファージスルト9中に固持されるDNA導入断片:

(b) 前記DNA導入断片に対してT₄以下約26~37℃に相当する条件下にハイブリッド形成し、かつCD2、T-リソバ球の表面のレセプターに結合するポリペプチドに対する発現上にコード付けするDNA配列: 及び

(c) 前記DNA配列又は導入断片のどちらかにより発現に対して発現上にコード付けされたポリペプチドに対する発現上にコード付けするDNA配列:

2. 前記DNA配列(b)がT-リソバ球の表面のCD2に結合し、かつT-リソバ球と癌的細胞の間の粘着を防止するポリペプチドに対する発現上にコード付けする請求項1記載のDNA配列。

3. 前記ポリペプチドが可溶性である請求項2記載のDNA配列。

4. 前記DNA配列が、第3図の式H₁...H_nのDNA配列、第3図の式H₁...H_nのDNA配列、第3図の式H₁...H_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式H₁...H_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式H₁...H_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-H₁...H_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_nのDNA配列、第3図の式ATG-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-H₁...H_n-X₁...X_n-W₁...W_n-X₁...X

特表平3-501

12. 請求項1-SのDNA配列から成る群から選択されたDNA配列により発現上にコード付けされたポリペプチドであり、前記ポリペプチドはヒト起源の他のタンパク質が本質的に無いポリペプチド。

13. 前記ポリペプチドが、第3図の式A11-12-13-14-15のポリペプチド、第6図の式A11-12-13のポリペプチド、第2図の式Vet-kh-11-12のポリペプチド、第3図の式

A4-11-12-Ah-13-14-15のポリペプチド、第2図の式Ahe-11-12-Ah-13-14-15のポリペプチド、第3図の式A6-11-12-13のポリペプチド、第2図の式A5-11-12-13のポリペプチド、及び第3図の式A3-11-12のポリペプチドから成る群から選択される請求項12記載のポリペプチド。

14. 請求項9記載の单细胞免疫を発達する段階を含むポリペプチドの製造方法。

15. 形質転換した桜主が、CHO(BG8)、R1.1(BG5)、J-E(iY)(BG8)、大腸菌JA221(pLP1817c)、CHO(pLFA3M16)、CHO(pLFA3M17)及びCHO(pLFA3M18)から成る群から選択される請求項14記載の方法。

16. 請求項12又は13のポリペプチドから成る群から選択されたポリペプチドの免疫抑制又は促進に有効量と実験的に受け入れ可能な量とを含む医薬品組成物。

17. 請求項16の組成物から成る群から選択された組成物により選択的に受け入れ可能な万能で虫害を治療する段階を含む患者を治療する方法。

18. T-細胞テラセット、CD2+細胞を検出する求項12又は13のポリペプチド又はこれらポリペプチドから成る群から選択されたポリペプチドの有効量を含む過剰な又は微量されたT-細胞により特異的検出の過程をモニターする診断組成物。

19. T-細胞テラセット、CD8+細胞を検出する請求項13の組成物から成る群から選択された組成物として使用する段階を含む過剰な又は微量されたT-細胞により特異的検出の過程をモニターする方法。

20. T-細胞テラセット、CD2+細胞を検出する又は請求項18の組成物から成る群から選択された有効量を含む過剰な又は微量されたT-細胞により特異的検出の過程をモニターする別の手段。

四月 一九九二

DNA配列、組換DNA分子及び
リンパ球機能-結合した抗原-3の製造方法

本発明は、DNA配列、組換DNA及びリンパ球機能の結合した抗原-3(LFA-3)の製造方法に関するものである。更に別途には、本発明は、BMA型列が、CD2、即ちT-リンパ球の表面のレセプターに結合したLFA-3又はその誘導体に對して、適切な細胞免疫中の発現にコード付けすることを行ひとするDNA配列に関するものである。更に好適には、本発明のLFA-3及びその誘導体はT-リンパ球の表面のCD2に結合する。最も好適には、これらはまた、T-リンパ球と癌細胞との間の結合を防止する。本発明によると、これらのDNA配列で表現された細胞免疫とこれらを含む組成DNA分子は、ヒト起源の他のタンパクが本質的に無いLFA-3を製造するのに使用されて良い。それ故にこの新規な試験は、癌細胞と診断の組成物において及びこの発明の方法において使用されて良い。

本発明の背景

T-リンパ球は、癌的細胞及び癌細胞と癌細胞と相互作

用-リンパ球の機能及び抗原-3の細胞との相互作用は、高度に特異的であって、かつ構造的又は表面構造上の抗原は、T-リンパ球の表面の多くの群レセプターによる認識に左右される。

T-リンパ球と他の細胞のレセプター-抗原もまた、各種のT-リンパ球表面タンパク、例えば、CD2-レセプター複合体のCD3(T3)と補助分子のCD4(LFA-1)、CD6により促進される。それはまた、様的又は抗原-3表面に発現されるLFA-3、ICAM-1及びVHCのような抗原が存在される。また、T-リンパ球上の及び構造的又は表面構造上の補助分子は、相互作用して細胞間の結合を促進されている。従って、これらの補助分子は、癌-抗原-3と細胞と癌細胞とリンパ球との結合を促進し、かつ白血球-内皮細胞相互作用とリンパ球再活性化であると考えられている。

例えば、最近の研究は、CD2(T-リンパ球)とT-リンパ球の癌的細胞への結合を抑制するLFA-3(補助分子)の間の特異的結合作用があることを認めた。この結合は、T-リンパ球の表面化子の開始は本質的に「IL-2マスター」、「CD2へ結合した複製したリンパ球-結合した抗原-3及びT-リンパ球細胞の細胞」。

T-リンパ球-仲介された細胞毒障と抗原結合した3つの異なる抗原: LFA-1, LFA-2, 及び LFA-3; Proc. Natl. Acad. Sci. US 75(1978), 第779巻, 第71689-38頁(1982?)]。

LPA-8は、沈降一提示細胞、及び癌的細胞、特に甲状腺、粗粒腺、C11細胞、G-リンパ腫細胞、平滑筋細胞、血管内皮細胞、及び癌細胞等に見いだされる（スプリング、上記文献）。

ヒトLFA-3は、ヒト赤血球から搾製されている（ダステン等、上記文献）。これは、総合質量約50%の分子量60,000-70,000の糖タンパク質である。この糖製LFA-3は、T-リンパ球の表面のCD161へ結合しており、かつT-リンパ球と血球の接着を防止する（ダステン等、上記文献）。

しかし、治療と診断における基本的使用に対しても、医療のより妥当なE-3が、赤血球からの精製や入手されるものよりも希望されている。更に、被歯の使用に対して、E型肝炎ウイルス又はエイズウイルスのようなウイルスで汚染されているからしないと赤血球と異なる他の原料からのE-3を用いることがより好ましいであろう。

発明の特許

本発明は、これらの問題を解決する。本発明は、CB2、即ちT-リンパ球の表面のレセプターに結合するLPA-3とその誘導体を多量に提供する。更に好適には、本発明のLPA-3及びその誘導体は、T-リンパ球の表面のCB2へ結合しており、かつこれらはまた、T-リンパ球と脾臓細胞との間の結合を強化する。更に好適には、本発明は、可溶性形態のLPA-3に關する。

國立中國美術館

第1図は、ヒト末端のアミノ酸配列と、免疫親和性クロマトグラフィーを用いてヒト赤血球から精製したヒトLFA-1の各種ペプチド断片を示している。

第2図は、ヒト赤血球から得たヒトIgA-Eのアミノ酸配列から導出した化合成に由来したオリゴヌクレオチドDBBの5つのヌクレオチドを示している。

第3図は、ファージλBT13に抱持されるDNA挿入断片のDNA配列を示している。第3図はまた、ヒトλPα-3これから推定されるアミノ酸配列に対して発現にコード付けるcDNAのスクレオチド配列を示している。

第4図は、配列決定のプラスミドpMB91C関係部分を示している。

第9図は、ブローブ#-10, #9-11, #8-8, #7-2, #6-1, 及び#5-Dを示している。

最初の詳細な考察

発明者序は、2つのライブラリーから本発明のDNA配列を単離した：白血球細胞からの末梢血液リンパ球から得たした入る 116 cDNAライブラリーとヒト扁桃から得たした 2216 cDNAとライブラリーである。しかし、発明者序は、

するものである。本発明はまた、ヒト型認の他のクの本質的に無くかつエイズ又はH型肝炎のようなウ1より汚染されていない形態のLPA-2を提供する。

本発明は、これらの目的を、適切な半導体
表面にI₉6-3又はこれらの誘導体に対してコード付
配列を提供することにより達成するものである。更
明は、可逆性形態のI₉6-3に対する発現にコード付
とを特徴とするDNA配列を提供するものである。

本発明はまた、これらの群配列とこれらを含む甲状腺癌宿主とを含む組換DNA分子を競合するものこれらの中には、広範囲の各種治療及び診断の組成に使用するための本発明の組成ならびに抗体を含むことを可観とする。

本発明のDNA配列は

(a) DNA配列: ファージ入射T10に拘束される
断片:

(b) 前記DBF配列に対して、以下の約20~22
い条件下にハイブリッド形成され、かつ
ちアーリンバはの表面のレシピターへ接着
リペプチドに対して発現にコード付け
列：及び

(c) 前記DPA配列のいずれかにより発見に係
にコード付けされたポリマーチドに對し
にコード付けするDPA配列

これらウラジブリマーをスクリーニングす
る明者等は、一連の化学的に合成した非転写オリゴ
ヌクレオチドプローブを運用した。発明者等は、発明者
が赤血球から精製したSPA-3を適用して決定したRNA
片のアミノ酸配列を考慮してこれらのプローブを選
択する。これらの断片は、第1図に示している。発明者等は
このオリゴヌクレオチドプローブの構成を可能な限りす
る各種酵素からアミノ酸を選択した。

発明者等は、プローブの2つのブール：S₁を測定した。これらのブールを第2図に示している。S₂ホールド時間10-マードであり。かつLF₂-S₁は、38マード時間20-マードである。この後各のブールの高さに、発明者等は、ブールを各々が98-ホールド時間のブーケ----LP₂, LF₃, LF₄及びLF₅----に識別した。

スクリーニングするのに、発明者等は、ハイブリッド形成スクリーニング検査を利用する発明者等は、
cDNAライブライマーに対して、発明者等のオリゴヌクレオチドに、
プローブにハイブリッド形成した。発明者等は、
明者等のプローブに対してハイブリッド形成するか否かを
選択した。更に、選択したクローニングのcDNAを挿入断片
かつプラスミド中にラブクローニングした後に、興味ある

特表平2-5011

決定した。

発明者は、これらのcDNAの成長のヌクレオテッド配列(ファージスル16のcDNA挿入断片)とLFA-3とそれから推定されるアミノ酸配列に対してコード付けするcDNA配列を第3図に表現している。第3図に示すように、このcDNA挿入断片は、750bpの読み取り棒(250アミノ酸)、16bp 5'翻訳しない領域及び201bp 5'翻訳しない領域を有する。発明者はがヒト赤血球から精製したLFA-3から決定したN-末端アミノ酸配列を有する第3図の推定アミノ酸配列の比較は、アミノ酸-1~11は、信号配列から成り、かつアミノ酸1~222は成熟LFA-3のタンパク質配列から成ることを暗示している。

第3図に示されかつ用いたクローナルHT16に含まれるcDNA配列は、本発明に従って各種方法で使用される。これは、その一部、又はこれらの合成又は半合成コピーに、cDNAブローフとして使用して、他のヒトのcDNA又は動物のcDNA又はゲノムライブリーをスクリーンして良く、このゲノムライブリーは、LFA-3に関する他のcDNA配列を、ハイブリッド形成により選択するためのものである。代表的に、各回のハイブリッド形成条件、例えば、 5°C 以下の約20~21℃が、このような選択に適当される。しかし、より少ない温度条件は、ライブリーがライブリーと異なる種からのプローブでスクリーンされる場合に、例えば、ヒトブローフでマウスライブリーのスクリーニングする場合必要である。

第3図のcDNA、その一部、又はこれらの合成又は半合成コピーはまた、各種変異を認める出島酵母として使用される。このような酵母は、どちらかの形態であって良く、即ち、酵母は、底異コドン又は非標準によりこれに対して由

発化されるアミノ酸配列を産えず、即ち、変異は、コドンによりこれに対して暗号化されるアミノ酸をも。例えば、これらの変異は、より容易な精製又はLFA-3活性のような、より高いレベルの製造を可能。

これらまでの理由に対して、本発明のDFA配列、
(a) DFA配列: ファージスル16に組合される断片:

(b) 前記DFA配列に対して 5°C 以下の約20~21℃の条件下にハイブリッド形成され、かつT-リソバ族の表面のレセプターへ結合ペプチドに対して発現にコード付けられる、及び

(c) 前記DFA配列のいずれかにより発現にコード付けされたペプチドに對してコード付けするDFA配列

から成る群から選択される。

好適には、本発明のcDNA配列は、第3図の1~222(追加)-末端メチオニンを有する又は有しないこれら的一部に対して示される配列を有するペプチドとしてコード付けする。更に好適には、本発明に對するDFA配列は、より小さいタンパク質の製造を可能にする為にトランスクレプトラン部分に対してコード付けする部分を、それから、例えば、約682~715ヌクレオチドを有する為に、第3図のもの(アミノ酸1~222)に比較されるだろう。最も好適には、本発明のDFA配列は、タンパク質又はCD2に結合するペプチド、T-リソバ族のレセプターに対してコード付けする。更に好適に

本発明のLFA-3と講導体は、T-リソバ族の表面のCD2に結合する。最も好適には、これらはまた、T-リソバ族と他の細胞の間の接着を防止する。

本発明のDFA配列はまた、LFA-3又はこの講導体の表面に有用であり、これらは、これらにより、これらのDFA配列で置換される常細胞表面において、発現にコード付けされる。この分野で周知のように、本発明のDFA配列の発現に対して、DFA配列は、適切な発現ベクターにおいて発現制御配列に作戦的に結合され、かつ適切な半導細胞表面を変換する為にこの講導ベクター中にて利用されるべきである。

本発明のDFA配列の発現制御配列に対するこのような作用的結合は、DFA配列の上流の正しい読み取り棒における翻訳開始信号の提供を包含する。若し発現されるべき本発明の特徴的なDFA配列が、例えば、フェニルアラニンで開始する成熟LFA-3のようにメチオニンで開始されないならば、開始信号は別のアミノ酸において起こり、メチオニン、-生成物のN-末端に位置される。一方、このようなメチオニル-生成物は、本発明の生成物と万能に直接に利用されて良いが、使用する前にメチオニンを除去するのが一般的により望ましい。このような末端メチオニンをメチオニンで置換されるペプチドから除去する方法は、技術分野において提

高細胞の各種宿主/発現ベクター組合は、このDFA配列を発現するのに利用される。有用な発現ベクターは、例えば、染色体の、非染色体の及び合成のDFA配列から成り、このようなDFA配列は、SV40の各種複雑な細胞株プラスミド、例えば、c01-21、pCR1、pJ8322及びこれらの講導体を含む大腸菌からのプラスミド、宿主細胞プラスミド、例えば、pEP1、pFA1、ファージDFA1、ファージスルの多くの講導体、例えば、pJ989、及び他のファージ、例えば、Y13及び無症候一本鎖DFAアーバプラスミド又はその講導体のような講導プラスミド。ファージDFA又は他の発現制御配列を利用する為にまたプラスミドのようなファージDFAである。動物細胞に対して、発明者は、好んでプラスミドBG318、アデルス2の生細胞プロモーターを含むプラスミドを使用する。

更に、どの高細胞の各種発現制御配列-DFA作戦的に結合する時にこのDFA配列の発現を制御するこれは本発明のDFA配列を発現する為に、これらを併用して良い。このような有用な発現制御配列は、I-6T4D又はアーヴィルスの初期と後期のプロモーター、システム、I-6Dシステム、I-6C又はI-6Eシステム、ファのオペレーター及びプロモーター領域、14コート

は、好んでアデノウイルス2の主後期のプロモーターから誘導した発現制御配列を候用する。

両範囲の各種単細胞宿主細胞も、本発明のDNA配列を発現するのに有用である。これらの宿主は、大腸菌、シードセナス、パシラス、ストレプトミセスの菌株、イーストのような酵母、及びC3H及びマウス細胞のような動物細胞、COS1、COS7、BSC1、BSC40及び3T3のようなアフリカミドリウル細胞、及びヒト細胞及び組織培養の動物細胞のような周知の癌細胞と異種細胞宿主を包含する。動物細胞発現に対して、説明省略はマウスレ細胞を好む。

勿論、様々のベクター及び発現制御配列が、本発明のDNA配列を発現するのに充分に適しく作用するとは限らないことを理解すべきである。また様々の宿主も、同じ発現システムで充分に適しく作用しないであろう。しかし、当発明は、不適切な表現をすることも無く、かつ本発明の範囲から離脱すること無く、これらベクター、発現制御配列及び宿主の間で選択をすることが出来る。例えば、ベクターを選択する既に、宿主は、ベクターがその中に複製しなければならないことを考慮されねばならない。ベクターのコピー番号、このコピー番号を制御する能力、及び抗生物質マーカーのようないベクターにより増殖化されるなどの他のタンパク質もまた考慮されなければならない。

発現制御配列を選択する際には、各種の因子もまた考慮されなければならない。これらは、例えば、システムの相容性強さ、その弱弱受け易さ、及び本発明の、特に電位二次構造に関して特別なDNA配列との適合性を含む。供細胞宿主は、選択されたベクターとの適合性、宿主に対して本発明の

プライドは、癌的細胞とのこれらの相互作用を妨げることにより細胞増殖T-リソバ球活性を防止するのに適性である。これらは、ヘルペス細胞と抗原-提示細胞の相互作用を妨げる為に、免疫応答に対して自己効果を有する。更に、本発明の化合物は、癌細胞と免疫抑制の為の癌的細胞T細胞に、又はリソバ球カインのような分化薬に、特異的に標的とするT-細胞に使用して良い。更に肝臓には、本発明のポリペプチドの可溶性抗体は、T-リソバ球のCD4部屋を遮和するのに利用して且く、しくしてT-細胞活性化を防止する。この効果は、移植片排斥主疾患において、自己免疫疾患、例えば、慢性関節リウマチにおいて、及び同種異系統細胞排斥疾患の防止において明確に大きな有用性がある。更に、本発明のポリペプチドは、これが、ヒト以外の種に起こる抗体であるより、ヒトにおける免疫排斥を引きしめうる為に、LFA-1又はCD11bに対するモノクロナール抗体以上に好まれる。本発明の治療組成物は、このようないポリペプチドの免疫抑制又は免疫に有効性、及び薬理学的に受け入れ可能な抗体から代表的に成る。本発明の治療方法は、これらの組成物により薬理学的に受け入れ可能な方法において患者を治療する段階から成る。

これらの治療に使用する為の本発明の組成物は、各種形態を取る。これらは、例えば、剤、丸剤、粉剤、液体

DNA配列により発現にコードされた生成物の毒性、免疫活性、タンパク質を正確に折り疊じ宿主の能力、構成要素、及び本発明のDNA配列により生成にコードされた生成物の易燃の容易さを考慮することにより選択されなければならない。

これらのバラメーター内で、当発明は、既に又は大腸様の動物細胞、例えば、マウスL細胞等及び、本発明のDNA配列を発現するであろう各種ベクタ細胞システム/宿主の組合せを選択して良い。

本発明のDNA配列の発現により製造されたオチドは、発酵又は動物細胞培養から単離され、かつ分野で周知の各種方法で精製されて良い。このような製造技術は、各種因子、生取扱いがいかにして競合させが可溶性か不溶性かどうか、及びそれが相容かれるか又は細胞を破壊することにより単離しなければいかどうかのよう因子に左右される。しかし、当本発明の範囲から離脱することなく、適切な単離とを選択して良い。

本発明のDNA配列、例えば、gol-LPA-8(第31ノ段1-22)又はLPA-3(第8回のアミノ酸1-22)、好適なより小さく疎水性でない抗体体、又は更に好適な周知生抗体の発現により製造されるポリペプチドは、本質的にヒト起源の他のタンパク質を含まず、かつウイルスとエイズウイルスのようなライルスによりてない。

これらのポリペプチドは、免疫応答を遮断する有用である。例えば、本発明

一回又はそれ以上、患者に投与されるだろう。

一般的に、本発明の治療的組成物は、他の蛋白質がポリペプチド(例えば、α-インターフェロン)で使用されるものと同じ方法と組成物を使用して且つ投与されて良い。従って、ポリペプチドは、液剤で溶解され、投与直前に殺菌水で稀し、かつ若様に下、静脈内又は網膜内に経皮のような苦遠の投与と投与される。

本発明のポリペプチド又はこれらに対する、遮断組成物と方法にも有用である、T-細胞又はCD4細胞を検出し、又は自己免疫疾患、移植片排斥及び同種異系統細胞排斥のようない過剰又は過敏性とする疾患の過程をモニターする。

最後に、本発明のポリペプチド又はこれらに対する抗体は、B及びT細胞を分離するのに有用である。抗体に結合する時に、本発明のポリペプチド又はに対する抗体は、BとT細胞を分離するだろう。

本発明がより良く理解される為に、次のを附す。これらの実験例は、説明の目的のみのもつて、加減なる方針においても、本発明の範囲のとして解釈されるべきでない。

セックから入手)からトリプシン断片を生成し、かつ図1 図に示される部分アミノ酸配列を決定するのに利用した。

発明者等は、(Xs); 60, 沈殿によるハイブリドーマ培養とタンパク質アフィニティクロマトグラフィーとによるハイブリドーマ培養上清からモノクロナル抗体(Mab) L52/1(サンチーズ-アドリード等、既記)を精製した。次いで発明者等は、この精製Mabを保有して次の精製に使用する旨の権利化カラムを調製した。

発明者等は、カトリカルスの方法[マーチ等、Anal. Biochem.(アカリティカルバイオケミストリー) 第68号、第149頁(1974)]の方法の改良によりセファローズCL-1Bに対して精製Mabを結合した。発明者等は、透析セファローズCL-1B(ファルマシア、クプサラ、スエーデン)を1MBS, pH中で40mg/mlで氷上10分間透析し、次いでそれを蒸留水と0.1MリHClで洗浄した。発明者等は、透析セファローズを通過して出たケーブルとし、次いでそれを0.05MリHClと0.1MNaBCE₁(pH8.4)中の2-tag/s1 IgG(LFA-3 Mab又はマウス IgG)と共に洗浄抗体溶液へ添加した。次いで発明者等は、この分離体を回転しながら20時間透析し、次いでエタノールアミン50mMの添加と1時間の放置により脱脂炭酸性基を封鎖した。発明者等は、280nmにおいて吸光度を測定することにより吸着結合抗体に対して上清を検査した。結果は普通98%のマーチーであった。次いで発明者等は、カラム中にMab-結合セファローズを吐き、次いで規制タニマトグラフィーに刻して過酸する前に、それを1サイクルのpH1とpH2振盪液(下記参照)で洗浄した。

発明者等が、LFA-3を産出する品にオクタノ-β-D-グルコビラノサイド(OG)(カルビオケミー)を使用した時に、既ての段階は、高濃度洗浄の後まで同じであった。この時点まで、発明者等は、カラムを5倍量の堿酸脱脂液(PIE, 2), 150mlを含む0.15MリHCl、で洗浄し、次いでグリシン緩衝液(PIE, 0.15M NaCl, 1%OG)を使用してLFA-3を溶出した。結果アロフィルは、トリトンX-100で得たものと同じであった。発明者等は、既てこのLFA-3を¹²⁵I-LFA-3 Mabで「ラットプロート」検定法(ハクス等、Anal. Biochem.(アカリティカルバイオケミストリー)第119号、第142頁、(1982)]を使用して半定量的方法で検査した。

トリプシン消化とアミノ酸配列決定に対して精製LFA-3を調製する時に、発明者等は、T-グリコレーダーPを採用して、供給者(サンザイル、ボストンマサチューセット)の指示に従って、僅かに改良した方法で脱グリコシレートした。先ず発明者等は、エタノール沈澱(トリトンX-100又は粗骨連過(OG)によりデータージェントからLFA-3を分離した。次いで発明者等は、LFA-3を20μlの0.5%SDS, 0.2M 2-メチルグリコニタノールと共に5分間沸騰することにより溶解した。

次いで発明者等は、活性LFA-3を、最終容量50μlにおいて、既トリトンX-100と20mMのI, 10-ブエナントレロンを含む50mM

発明者等は、前記の既知タニマトグラフィン等、既記)によりトリトンX-100で可溶化して液化した。発明者等は、既ての段階を4°Cで発泡した。発明者等は、使用期間を過ぎたヒト赤血球カットオフ(ニードマン、マサチューセット)から得た者等は、1ニットの全血液からの細胞をPBS(pH7.2)洗浄した。次いで発明者等は、充氣瓶を約500mlまでとし、次いで搅拌しながら赤血球へ既トリトンX-1ニールメチルスルホニルフロライド、5mMコードアド及び0.2トリプシン阻害剤ユニット/ml(アプロア)を加した。1時間後、発明者等は、細胞物を150,000g心分離した。次いで発明者等は、透析細胞液を流速2つのカラムに順々に通した。(1)既らかの不純物かうどの粒状物も通過するのみマウスIgG-セファロフィル(0.02g/mlで5ml)、及び(2) LFA-3 Mab-セファロム(1mg/mlで5-10ml)。発明者等は、LFA-3 Mab-セファロムを、3カラム容量の50ml洗浄ナトリウム(pH: 0.25M NaCl, 0.1%)トリトンX-100、次いで5カラム宮トリニチルアミン(pH11)、0.25M NaCl、0.1%トリト及び再び5カラム容量のpH7.2の透析液で、捨て10mlで洗浄した。次いで発明者等は、透析LFA-3を5mlの50mMグリシンHCl(pH3)、0.25M NaCl、0.1%トリトで20ml/時間の流速にて放出した。発明者等は、既てI, 10-ブエナントレロン(pH8.4)、0.15トリトンX-100中に含めより中和した。

発明者等は、調製用SDS-PAGEと電気泳動妨LFA-3(25Kd)を処理して高圧に精製したT-グルカナ-製した。発明者等は、アルミニウム160°Cで5分間、T-グルカナ-処理LFA-3(約3500キロ)を250mlのT-エチルモルヒジテート中の5mMDTT, 1mMDTA, 0.2%SDS(pH8.25)し、次いでそれを透析で22°Cにて38時間、11kbarトリクムでアルキル化した。発明者等は、生成物(I-3)を、0.35SDS, 250ml T-エチルモルヒジテート(pH8.25)で平衡させたセファログロスG-150でデルムにより純度し、それを凍結乾燥した。次いで発明者等は、既透析したI, 10-ブエナントレロンを10mlの黒水エタノ-脱し、-20°Cで7日間貯蔵し、LFA-3を4°Cで30分間60度心筋離することにより実した。発明者等は、沈殿物(約1.8M NaCO₃)中に溶解し、次いでそれをペビンTBC(ジャーナル、バイオロジカルケミストリー)第24289頁、(1986)に記載のようにしてTPCE-トリプシンで消化した。発明者等は、消化物を精製で最終酸性まで酸性とし、既くに既てのT-グルカナ-カラム(アクアド-0.8, 21×10cm、ブランツリー(フーブス)で逆相高圧タニマトグラフィーにより精製を分離した。発明者等は、既テペラードを、流速0.3ml/分(0.5分の分画を収集)7

4281 ガス相シーケンサーを使用する自動エンドマン分解 [ヘビック等、US、(グーテル・バイオロジカル・ケミストリー) 第1567号、第7600頁、(1981)]に付した。発明者等は、アブライド・バイオシステムズ 180k PBI 分析機を使用するセンタインでPTP-アミノ酸を同定した。無極性タンパク質の配列決定は、第1図に示すように28個のアミノ酸の配列を与えた。

オリゴヌクレオチド プローブの合成

発明者等は、最少核酸縮短により特徴づけられる LPA-8のアミノ酸末端配列(第1図の下段部参照)からの核酸に対してコード付けする赤外線メトリゴスクレオチドDNAプローブの2つのペールを、アブライド・バイオシステムズ 20k による合成機により化学的に合成した。各々の選択したアミノ酸配列に対して、発明者等は、組での可能なコドンへ相應のプローブのペールを合成した。発明者等は、cDNAのみならず DNAの好適配列へこれらのハイブリッド形成を可能にする赤外線プローブを合成した。発明者等は、[α - 32 P]-ATPとヌクレオチド・カーネギー・マックス社とギルバート、

Proc. 811, No. 501 (プロシードイング・カナル・アカデミー・サイエンス) 第74号、第550頁(1977)を参考して、発明者等のオリゴヌクレオチドプローブに操作した。

第2段に示すように、オリゴヌクレオチドペール LPIは、22-ヌクレオチド縮短を有する20-マーである。プローブペール LP2-Sは、284-ヌクレオチド縮短を有する20-マーである。しかし、その縮短を縮小するのに、発明者等は、Gにに対する縮短したコドンを各々のナブソールに對してその4つの可能なヌクレオチドの一つに開拓することにより、96-ヌクレオチド縮短を有する20-マーである。

バナジル脱色体、5μMオリゴ dT₁₂...、20μM GTP、1μM CTP、4GTP、4ATP、0.5μM DATP、2GMP-NaCl、1μM dCTP、dGTP、dATP、0.5μM DATP、脱容量50μl中での α - 32 P]-ATP及び300U、5μM ATP-逆転写酵素(セイカガク・アメリカ)へ添加した。発明者等は、混合物を3分間室温にて、次いで5時間40分にて培養し、次いで5M EDTAの1.5mLを添加することにより反応を停止させた。

発明者等は、反応混合物を等量のフェノール:クロロホルム(1:1)で抽出し、水溶性層を0.5容積の10%硫酸アセト酸と2.5容積のEtOHで2回沈殿させ、次いで真空下に乾燥した。cDNAの收量は1.5μgであった。

発明者等は、合成中にDMSオリメラーゼ(大型断片を使用した以外は、オカヤマとベルグ[No. 1,012]、(モレラーラ・セルラー・バイオロジカル) 第2卷、第161頁、(1982)及びグリラーとナフマン(遺伝子、第25卷、第289頁、(1983)]の方に従って第2段を合成した。

発明者等は、30と471種新規[6,038Nトリスアセチート(0.027, 8); 0.066M酢酸カリ: 0.01M酵母マグネシウム: 0.86M EDTA; 50μg/μlBSA], 5μM GMP、1ユニットのBクレーゼ、50μM β-NAD、8ニットの α -D-グルコ-β-1,4-アミノ酸、0.3155mM ATP、ACTP、ACGP 及びATPP、10mM ニトロセニル-β-

ヌクレオチド縮短の4倍のナブソールの各々の中にこのペールした。次に赤外線等は、前述したように、ヒト脳由来するノーザンプロット法に対して [クオルナーナature(ネイチャー)、第326卷、第77-81頁(1986)]、ペールのハイブリッド形成により、不正確な配列3個のペールから正確な配列を含むナブソールを過ヒト無筋肉DNA中の1860ヌクレオチド範囲に對してハイブリッド形成されたオリゴヌクレオチドプローブを用いて正確な配列を含んだことを明示した。従って、男の発明者等の各諸ライプラリーをスクリーニングするにとするとペールLP1を適用した。

ヌクレオチド縮短DNAライプラリーの構成

発明者等の赤外線DNAライプルを調製する為に、発明者等は、虫媒を障害する一連の白血球運動群によりPBLを操作した。次いで、非粘着細胞を10⁸~10⁹U/mlと10μg/mlPHAで2週間した。発明者等は、フェノール抽出を用意してこの細胞からRNAを用意し[マニアティス等、分子クローニング(コールドスプリング・ハーバー・ラボラトリ)、次いで一連のオリゴDNAセルローズクロマトグラフ・ウエーブルを調製した。発明者等は、このRNAをヒル沈降し、それを高純度で乾燥し、次いでこのRNAをH₂O(0.5μl/μg)中に再分散した。発明者等は、CH₂Cl₂ (最終濃度)及びB-アルカブトジタノール(0.5μl/μg)にて10分間処理した。次いで発明者等は、メチル化RNAを、42°Cで0.1Mトリス-HCl(0.8, 3), 0.01%

をエクノール沈没させた。收率: 60.5μg cDNA。発明者等は、次に方法を使用して、二本鎖シーカー33/35に結合した。

5'-AATTCGACCTCCAGCGCGCCCGCG-3'
3'-GCTCCGACGCGCGCGCGCG-

次いで発明者等は、5S1Gセファクツル・カクタムでEcoRIとより長い断片に大きさ分別し、それをECDRIKとECDRIJに結合した。発明者等は、既知者の固定付酵母 α -D-グルコ-β-1,4-アミノ酸(酵母連子)中に結合反応物の一連を測定した。発明者等は、支錠マークを使用して、大腸菌BL21に感染させ、次いで培養の為に細胞を散布した。得られたライプラリーは、1,183×10⁶の独立組換え体を含んでいた。

ライプラリーのスクリーニング

発明者等は、ヒト脳丸とgl198 cDNAライプラリー等、Proc. Natl. Acad. Sci. (プロシードイング・ナカダミー・サイエンス)、第77(11-12), 51, 及びペントンとディビス[Science(サイエンス)、第180頁、(1973)]のブラーク・ハイブリッド形成スクリーニング技術を用意して、上記調製したPBL cDNAライプラリーを用いて、

37°Cで8時間培養した後、発明者等は、プレート上のフィルターを引き上げ、これらを0.5M $\text{NaOH}/5\% \text{SDS}/1\% \text{S}\text{C}1$ のブールに5分間置くことにより溶解し、次いでこれらを同じ培養液中に5分間浸漬した。発明者等は、これらを0.5M $\text{Tris}-\text{HCl}$ (pH7.4)、1M NaCl 中に、5分間づつ2回洗浄することによりフィルターを中和し、これらを1% PAA 中で2分間洗浄し、次いでフィルターを乾燥し、次にこれらを80°Cで2時間ペーパークした。

発明者等は、0.2%ポリビニルピロリドン、0.2%フィラル(IV400,000)、0.2%牛血清アルブミン、0.05Mトリス-EC1 (pH7.5)、1M塩化ナトリウム、0.2%ビセチル酸ナトリウム、1% SDS、10%酢酸ゲキストラン(IV500,000)及び100*μg/ml* PMA中に、オリゴタクシオチオプローブ LPPに対してフィルターに重複ハイブリッド形成及びハイブリッド形成した。発明者等は、オートラジオグラフィーによりハイブリッド形成する λ -DNA配列を検出した。

発明者等は、PBLタイプライターから λ 正ファージをかつて流ライブライターから λ 正ファージを始めに選択した。次いで発明者等は、これらのクローンと、同じプローブを使用して底面密閉でこれらを用意したプローブを再スクリーンした。

発明者等は、これらクローンから単離したDNAをEcoRIで消化し、次いでこれらをサバンプロート技術[乙1.ナイン、J. Mol. Biol. (チャーチルコレクション)バイオロジー]第88巻、第103-112頁(1975)]を使用してオリゴマープローブ及びLPPに対してこれらにハイブリッド形成した。次いで発明者等は、更に純流ライブライターの8つのクローン

を使用した。 λ NN01の構成は、 λ holI消化と4つの20-ヌクレオチド長プローブ: HN-A、HN-B、HN-C、及びHN-Dを使用する挿入した断片の重複の配列決定をチャーチ-ギルバート研究室により可視化する。第5回参照のこと。

2つの重複性配列決定の結果が、チャーチ-ギルバート方法により発明者等のサブクローンからえられた。一つの実験において、発明者等は、224bp EcoRI断片を軸台するEcoRI部位を越えて配列を決定する為に、LPI9とLPI1(第5回)に関係なく λ NN01から λ NN1消化断片を認証した。このことは、このアーチの2つのEcoRIサブクローン(λ NN1と λ NN01)の分析は、小さいEcoRI断片への5'又は3'のEcoRI断片の端のS'のいずれかの配列を見落としていた可視化を直接的に反証した。発明者等はまた、このEcoRI部位を重複化するholIサブクローン構成した λ NNの分析によりこの結果を確認した。発明者等はまた、 λ NN1でPstIを消化し、かつハイブリッド形成プローブとしてLPI10(第5回)を使用するチャーチ-ギルバート方法により断片の配列を決定した。このことは、挿入断片の5'末端は λ NN01の5'末端と全く同じであったことを証明した。

第5回は、ファージ λ NNのDNA挿入断片のDNA配列を示している。これはまた、LPA-Bに対してワード付ける

(λ NN1と λ NN01)からのDNAとPBLタイプライターからサブクローン(2 P26と2 P24)からのDNAをDNA配列決定分性質を調べた。

λ -DNAクローンの配列決定

発明者等は、配列分析を促進する為に、 λ NN1と2 P26からのEcoRI消化したDNAを、pNN01をローン化した。 λ NN1は、2 EcoRI断片を有しており、これらは、プラスミドNN1とpNN1に接するpNN01断片をサブクローン化した。 λ NN1の端での挿入断片holI断片上に含まれている。サブクローン化の過程等は、普通に使用される技術を適用してベクター部位又はSmaI部位を活用した。

発明者等は、制限消化により合成ポリリンを除去し、かつそれを新しい合成断片で置換すること配列決定プラスミドpNN01を構成した。pUCプラスミドSmaI部位は、複製開始点を付与し、かつアンピロジンを導入するものであるが、型化なかった。pNN01の合成部分は第4回に示されている。

発明者等は、マックサムとギルバートの方^{Bezymenov、(微生物学方法)1980}により発明者等の一つのDNA配列を大筋分決定した。しかし、残つかつとして、発明者等は、チャーチとギルバートの関連[Proc. Natl. Acad. Sci. USA(プロシーディングス・オブ・アメリカ・サイエンス・米国)第72卷、第1091]

λ NN01断片中にLPA-3' HN18-CPAの発現

下記p λ NN16LPA8±2の964bp EcoI-HaeI断片発現ベクターを与える為に、BG31発現ベクターのS'中に挿入する。ベクターBG31は、インヒトニンクナルカルチー-ブレクション、G3P、ハコントス-2d、ワニチカム、マリーワンD、21880(5月26日)で預けられており、かつ登録入番号1V-18110で登録している。BG31[ナイトホ、Cell(細胞)、第45巻、第988]において、挿入断片DNA配列の発現は、アノ-2後期プロモーターの制御下にある。p24H18LPA8±2の804bp EcoRI断片をプラスミド部分を含むS'の大断片と結合することにより構成された。p24のEcoRI断片は、第9回の構成 λ -223のDNA配列に一致する。 λ NN-CPN細胞系を確立する為に、発明者等は、 λ NN-CPN細胞[スジンとウルバン、Proc. Natl. Acad. Sci. USA(プロシーディングス・オブ・アメリカ・サイエンス・米国)第76卷(1980)]を、180*μg*のKanI消化BG31のS'の5'端消化PstI-S26 DNA[カリフマンとシャーネーCell. Biol. (コレクター・セル・バイオロジー)、第1604号、(1982)]、及び300*μg*PDに設定したナバシタ0.2mMにてビオラビリックマンド、カルカルニア)

特許2-50111

-LPAプラス200mM、400mM又は800mMメトトレキセートのいずれか中にて底張させた。コロニーは、200mMメトトレキセート中で最も良く成長し、このコロニーから、発明者等は、個々のコロニーを分離し、貨先活性化細胞ソーター(FACS)ベクトン(ザ・キンソン、マウンティンビュー、ガルホルニア)で間接的免疫染色の強度を測定することによりLFA-3の発現に対して、かつ下記のようにロゼティング(細胞粘着)に対して検定する為に、100μLプレート当たり 1×10^6 細胞までこれらを成長させた。

FACSにより分離する為に、各HT16-CHOメトトレキセートクローリー当たり 1×10^6 細胞と制御CHO細胞は、 4°C で15分間、ハンクのSSS(スペクトラクト)緩衝液、0.5%EDTAと共に培養することにより、粗様培養液から除去された。次に分離した細胞は、ベレットとされ、50μLのPBH緩衝液(1XPBS、0.3%BSA、0.1%ナトリウムアシド)中に再分散し、15分間水上で $100 \mu\text{L}$ をノクロナール抗体TS2/9(1.2mg/mL)(チムスプリングルの贈り物)で培養した。次に発明者等は、10μLのPBH緩衝液で2回細胞を洗浄し、次の分離液でベレットとした。この細胞ベレットを、PBR中の1:50稀釈PCD(蛍光共役細胞精製P(ab')2断片ヒツジアンチマクス IgG(ラベル、バイオケミカル、センシルバニア)]の $100 \mu\text{L}$ 中に再分散し、次いで80分間水上で培養した。細胞を遠心分離器でベレットとし、過剰のPDIを細胞ベレットを、IgGのPBH(スペクトラクト)緩衝液中に2回再分散することにより除去した。次いで発明者等は、細胞を1XPBS $600 \mu\text{L}$ 中に再分散し、次いでFACSにより蛍光強度を検定した。5つのクローリーが、制御CHO細胞とLFA-3発現に関して培養細胞よりもより高い蛍光を示した。

胞末で希釈することによりクローリーを磁離した。5つの耐性クローリーを繁殖させ、前記したようにFACS分析によりLFA-3表面発現に対して検定した。発明者等は、総ての5つのHT16-R1.1クローリーが、R1.1細胞より約25倍のレベルでLFA-3を発現したが、しかし培養液中にLFA-3発現を認して均一細胞集団を示したことを見いだした。

更に発明者等は、FACS上の高い発現度の5つのクローリー-R13とR15-1を選択した。各々のクローリーの 1×10^6 HT16-R1.1細胞を、PBH緩衝液(1XPBS、0.3%BSA、0.1%ナトリウムアシド)中、水上で45分間、 $100 \mu\text{L}$ TS2/9(1.2mg/mL)培養液中に再分散することにより、ベレットを3回洗浄し、次いで細胞ベレットを $100 \mu\text{L}$ の1:50稀釈PCD中に再分散した。水上に30分間薄い六角に、細胞を洗浄し、次いで $200 \mu\text{L}$ 1XPBS中に再分散した。HT16-R1.1R13とR15の選別した均一細胞中にLFA-3の表面発現は、JY細胞のものの16%である。

次ぎに発明者等は、R1.1細胞中に発現したようなHT16-CHOからLFA-3が、CD2-cDNA(L111)(チムサリンヘンシンの贈り物)を発現する細胞と、かつHT16-CHOに対して前記したような同じ方法を使用するジルカット細胞(チムスプリングルの贈り物)と合わせて細胞一チムスプリングルの細胞を

次ぎに発明者等は、CHO細胞中に発現したLFA-3が、ロゼット形成分析によりCD2発現細胞に粘かどく試験した。発明者等は、制御CHO細胞と、 1×10^6 細胞の細胞密度で5ウェル細胞培養プレート 8.0cm^2 ウェル中でLFA-3(HT16-CHO-L111)を発現する細胞を培養させた。プレートを、 4°C でソーパール遠心分離で2分間 $100 \times g$ で回転した。細胞を2時間 4°C で培養細胞を RPMI1640メディウムで洗浄して過剰のグリコ糖を除去した。ジルカット細胞は、細胞瓶下に時に、LFA-3発現のHT16-CHO細胞とロゼット形成

発明者等は、HT16-CHO細胞中のLFA-3の表面レベルをJY-8リンパ球球的細胞(チムスプリングル)の発現レベルと、 2.5×10^6 JY細胞、CHO細胞及びHT16-CHO細胞を使用して、前記したようにFACS分析を使用し、培養液の相対的蛍光強度を比較することにより比較。HT16-CHO細胞は、JY細胞より6倍高い蛍光強度を示した。

R1.1細胞中にLFA-3 HT16-cDNAの発現

5×10^6 R1.1細胞を、前記したような $90 \mu\text{L}$ 化した尾良ベクター-BG8、 $30 \mu\text{g}$ XbaI線状化したP₁-cDNA[P₁クロスベルト等、*Recombinant Cell Line*(版一)、第10章、第6715頁(1982)]、及び前記したようクトロボレーション(280ギルト、 $500 \mu\text{L}$)により300次過濾したサケ精子DNAと共に共移入した。RPMI1640 $1 \text{mg}/\text{ml}$ G418中の移入細胞を希釈した後に、発明者等 $100 \mu\text{L}$ RPMI 1640メディウムプラス $1 \text{mg}/\text{ml}$ G418をウェルマイクロタイタープレート中、ウニセル当たり

細胞の細胞表面に発現されることを承した。HT16-CHO又は末移入R1.1細胞は、未侵入マクスレ細胞と二度せず、これらの細胞の相互作用の的器性を示すも。

ヒ細胞中にLFA-3 HT16-cDNAの発現

発明者等は、 1×10^7 L11(1)細胞[G.P.チムホーリー(チャーチル・イェンロジー)、第13章、第2(1982)]を、前記したようにXbaI線状化BG8プラス₁-cDNA₁線状化pOPPEプラス₁-cDNA(クロスベルト等、上(移入細胞を選別するのに使用出来るチミグラン・チナーブラスミド)、及び前記エレクトロボレーションにより過濾したサケ精子DNA $300 \mu\text{g}$ と共に共移入した。細胞し、次いで $100 \mu\text{L}$ ベトリ皿に移した後に、発明者等これらを48-72時間、非選択性メディウム(DMEM)中で種々、次いで移入され元細胞を、 $100 \mu\text{L}$ 当たり 1×10^6 細胞密度で、DMEM₁とチムサンテン・アミノブリジン・テ(ABT)中で選択した。発明者等は、14日後に13クローリーするチミグラン・チナーブラスミドを含む上(100μL当たり 1×10^6 細胞)に引かせし、前記したようにFACS分析LFA-3発現に対して検定した。11個のHT16-Lクローリー細胞中にR1.1細胞とR15細胞を混合して、前記の細胞を

卷之三

試したが、その理由は、これらクローンは、LFA-1発現の均一細胞表面を示したからである。BAT-IMR8とディフィオウ中に選択された6つのクローン-H516-L-1A, 1B, 1C, 2, 47, 及び109--は、PACS分析によりLFA-1が発現に対して検定された。発明者等は、対照CHO細胞の蛍光強度より33倍高かったクローンH516-L-1C以外は、20~30倍の蛍光強度を示す他のクローンを見いたした。

発明者等はまた、WT15 cDNAからのLP4-3が、L-細胞中に導入された時に、HL-3細胞中に発現されたLFA-5に対し上記同じロゼット形成の検定を併用して、他の細胞に粘着するかどうかを試験した。結果舌等はロゼット形成を観察した。

大島附近にLFA-3の発見

大腸菌中に λ -cDNAを発現する為に、弊社ベクター
 -pLFA33::crtl各種成した。このベクター(pKK238-3の導体)
 は、成熟LTP-3タンパク質を誘導する。シグナル配列に対し
 てコードするHT16 cDNAのDNA配列は削除された。pLFA3
 ::crtlを構成する為に、プラスミドpKK238-2 [E.アマンとJ.
 ブロフィックス、*Gene*、(送信子)、第10巻、第183頁、(1985)]
 を制限酵素 H paⅠと R (HindⅢ)で消化し、かつpLFA33UJ19の半胱
 109蛋白質に対する抗体の断片と2本鎖リソマーレF21-82へ結合
 した。このリソマーレは、HT16 cDNAの塩基配列101-175(Eva2部
 位へ)の前の配列を誘導する(第5図)。

次ぎに細胞は、 37°C でOD₆₀₀ 0.3まで、12 LB + SG
培地/1アンプシリン中で増殖させた。LFA-3の発現は、2時間
ZEN/PTGで誘導された。細胞は、30分間5000 rpm/ 4°C でペレ
ットとされた。発明者等は、このペレットを、10 mlトリス緩
衝液当たり1 mg割りペレットで25 mMトリス(pH 7.0)中に再分散
し、細胞圧力12,000-14,000 psiでフランスプレッシャー
セルプレス中で溶解させた。次に塊分画を、 4°C で30分間
10,000 rpmにてSS34 ソルバール中で遠心分離により可溶性タ
ンパク質から分離した。既ペレットを、25 mMトリス pH 7.0の
1 ml、ミオアリコートの上槽中に再分散させ、次ぎに膜ペレット
を、15% SDS-或速PIG上で電気泳動させた。既ペレットを
SDS緩衝液に溶解し、クンバク質は、SDS-PIG、汚染マーク
シーアジヤブリーケントタンパク質の配列決定用のグルタ
ラルdehydeされたLFA-3とにより分離された。発明者等のアミノ
酸配列決定は、NPSQQYGYVYVGYV-LFA-3とPSQGIVGYVYVGYV-
LFA-3としてN-末端配列を確認し、これはニト赤血球から精
製したヒトLFA-3に対して決定したN-末端配列に一致した
[バルナード、*J. Exp. Med.* (ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル
メディシン)、第168卷 第823頁(1983)]。従って、この指紋
により精製した生成物は、メチオニンを有する又は有しない
N-末端を有する。

EF313

3' CAGTGTTCGCCAACGATATATGGTGTGCTTTCGGG
 TAACCTTCCATGT ACCGAGCACTGCGCCCTT
 TAAAGG 3' 18 bp

1821:

5' GACCTCTTTAACACATCTGCTTGGCTAC11GGAAA
 ACATTTCCATACACATACCCATATCTTGTGTC
 GGGAAAG 3' 78 nt

発明者等は、得られた細胞を発見ベクター細胞と形質転換した。PLFAG19clで形質転換した大OD₆₀₀ 1.0へ成長させ、続いて1時間後IMCで処理後心筋系酵素により細胞を破壊した。細胞をLB中に適量のOD₆₀₀を除去した。次いで発明者等は、器によりペレットとし、この細胞ペレットをOD₆₀₀ 1.0の緩衝液50 μL中に再分散し、次いで3分間振搗しの試料を、恒温冰浴によりクタンパク質を分離する2変性ボリアクリルアミドゲルに捺塗した。LPA-3を斜に、タンパク質をニトロセルロース膜へ電気泳動にて抗体のanti-LPA-2、Y54C5ムスプリングルの時とする1:1000希釈で膜を培養した。発明者等は、抗LPA-2は25-50タンパク質を検出し、形質転換細胞が用いたことを示唆したことを記載した。

LP1-2411欠步

50 μgのプラスミドpET16LFA3-DNAを、2%制限酵素Realの100ユニットで消化した。発現培養ガーネースグル上電気泳動により未カットプラスミドを分離し、ゲルから切除し、電気炉中のアリコートの30μgのpET16LFA3プラスミドDNAをEcoRIとS100ユニットHindIIIで27°Cにて1時間消化のプラスミド中の大部分のLF1-8 cDNA配列を切除しベクターを、1%アガロースゲル上で電気泳動にてHindIII断片から分離し、切離し、次いで電気泳動発現培養は、欠失を導入する為に、すすきチバLP11を使用した。これは、第3回に成した1例の塩基対622で開始する21スクレオチドと塩基が開始する62スクレオチドに相当する43 bp(第11基)である。

卷之三

LPT 5

8' TAGGGTTCGTCGCCCTGTA>ACTYACCA&AOAC

LFI 5

特表平2-501111

正位置欠失を証明する為に、DNAをEcoRIとHindIIIで当該のLF18M17コロニーが、正確な制限パターンを有する一つのタローンの正確なDNA配列を、マクスマとギルの方法(第2文献)を採用してDNA配列決定により確認。

(第1表続)

LF18:
5' CAGGGCCCCCCCCCCCCCTCCGCTCCCAAC 3' \$0.90T

このオリゴヌクレオチドが、一本鎖HT16cDNAに対してハイブリッド形成される時に、これはHT16cDNAの118塩基対の外にループ形成するだろう。電気泳動Scalの2BPセルとEcoRI/HindIII断片の2BPセルは、端粒化LF17の100セルと混合され、次いで300M $MgCl_2$ 、8mMトリス(pH7.6)及び2mM $MgCl_2$ 、中で5分間37°Cにて透析され、37°Cで1時間、4°Cで1時間、次いで水上で10分間培養することにより活性化された。反応混合物の半分に、発明者は、0.5mM T4リガーゼ、1mM ATP、1mMクレノンクレオチド及び50U T4Tを添加し、次いで混合物を一晩37°Cで培養した。反応混合物の他の半分を、M1366遮光細胞中に転移させた。欠失LFA-3 cDNAを含むコロニーを、次のように、LF17にハイブリッド形成することにより同定した。形成後移したM1366コロニーを、ニトロセルロースフィルターに移し、溶解し次いでEBAを0.5M $MgCl_2$ で処理することにより活性化した。ニトロセルロースフィルターは、一晩37°Cで、1×10⁶cpm/ul 32P-キナーゼオリゴヌクレオチド LF17を含むPSB中でハイブリッド形成させた。フィルターを0.1×SSC(0.015M 硝化チオウム、0.0015M クエン酸ナトリウム)中で洗浄し、X-線フィルムに露光させた。正コロニーを、拾い上げ次いで37°Cで培養し、次いで活性化した。次いで発明者は、DNAを複製した[マニアクィス等、「分子クローニング:実験室マニュアル」コールドスプリングハーバー(1982)参照]。

次に発明者は、既ての除去したLFA-3 cDNAを、透析槽を更に活性する発現ベクター中に挿入した。発明者は、組込み中にLFA-3遺伝子に近接する同じプラスミド上に、透析槽を有することは、これら2つの透析子の組み込みと、従って、これらの非選択を確実にするであることを信じる。発明者は、発現ベクターpJCD-2を用いた。ベクターpJCD-2は、1985年5月26日に、メリーランド州、リンテカムのインヒトロインターナショナルインク、カルチャーリフレクションに渡り、受け入れ番号171-10171が発表されている。LFA-3遺伝子及びR29の構成の為に、pJCD-2ベクターを制限酵素SalIにより端試しし、クレノーに上り平滑末端とし、クレノーブラント末端PstI断片のpEP48X17。pEP48X17又はpLFA8M17に上り端粘合した。次ぎに次々の連続反応混合物を、M1366中に形成後洗し、矢印のDNAを含むコロニーを、オリゴヌクレオチドアーロープ(第1表添成)、HT16 cDNAの端基対26-49に相当する20マー-ヘ-LF18 PSB中にて65°Cでハイブリッド形成することにより選択し、65°Cで0.5MSSC(0.15M $MgCl_2$ 、0.015M $MgCl_2$)にて洗浄した。正コロニーを拾い上げ、LB-amp 50 μ g/ml中で一晩増殖させ、かくしてDNAを回収した。挿入断片の正確な大きさは、制限酵素マーピングにより確認された。pLFA8M17のようないくつかのタローン、

LF1-3519

プラスミドpLFA42M18-2-40を、欠失を導入するオリゴヌクレオチドLF16(第1表)を適用した以外は、3K11に対して本質的に配列したようにして構成した。21ヌクレオチドが端基対632-651(第3図)に対して相合り、かつ21ヌクレオチドがLF16 cDNAの端基対716-731(図)に対して相合りあるところの42bp(マー)である。マクスムアンドLF16による変位活性は、LF1-8の株式活性遮断域に対してコード付与する端基対配列を除去遮断域の領域を既にされた。発明者は、アンドLFA8M16を分離し、かつ上記のようにその正確な配列を明確にした。

LF1-3483

プラスミドpLFA13M23をpLFA3417に対して記載法により精確した。変位活性に対して使用したオリゴヌクレオチドは、LF18(第1表)であって、そのマーは、21ヌクレオチドが端基対643-661(第3図)に対して相合り、20ヌクレオチドがHT16 cDNAの端基対767-786(第3図)で相合るところの61マーである。LF18による変位活性端基対領域及びHT16-LFA-3の細胞質側を除去し、

安定なCHG細胞系を確立する為に、P11で採取されたpLFA8M17の10ルート、活性カルシウム液と前記エタノールーションによりCHG細胞中に移入した。同じ方法pLFA26M17とpLFA3417で安定CHG細胞系を確立する為にした。

pLFA3417で移入されたCHG細胞は、³²Pメチオ代謝標識化することにより既存LFA-3の分泌に対応した。6ウェルプレートのウェル当たり5×10³細胞がメチオニンで8時間標識化され、かつ³²P-LFA-3を5M²で沈殿させた。発明者は、M17/CHGがLFA-3を分泌したことを確認した。このことは、より高い発現を得る為に、M17/CHGはメトトレオセートの高い濃度で培養され、LFA-3遺伝子を増殖するのが良いことが理解されるべし。

上記の発明を達成可能にする為に、発明者は、発明のLFA-3 DNA配列を担当する次のファーマを、アンド、リンテカムのインヒトロインターナショナルインク、カルチャーリフレクションに1985年5月26日に預けた。

3. HT1E(アンドLFA-3)

4. のファーマセークス・カム・アンド・カンパニー

第1頁の続き

⑤Int.Cl.*

C 12 N 1/21
5/18
C 12 P 21/02
G 01 N 33/53
(C 12 N 1/21
(C 12 R 1:18)
(C 12 P 21/02
(C 12 R 1:19)
(C 12 P 21/02
(C 12 R 1:91)

添削記号

C
K

序文記号

7421-4B

8214-4B
7906-2G

⑥発明者 スプリンガー, テイモシー エ
イ
アメリカ合衆国、マサチューセツツ 02167、ニュートン
ノック コード 28

⑦発明者 ヘンション, キヤサリン
アメリカ合衆国、マサチューセツツ 02190、サウス ウ
ス、6、ファンティン レーン 98

⑧発明者 ティザード, リチャード
アメリカ合衆国、マサチューセツツ 02139、ケンブリッ
バー テー-3、ハーバード ストリート 334

⑨発明者 マグリアノ, ロバート
アメリカ合衆国、マサチューセツツ 02158、ニュートン
ト サイド パークウエイ 114

⑩発明者 ダステイン, マイケル エル
アメリカ合衆国、マサチューセツツ 02215、ボストン、
メント 23、パーク ドライブ 231

⑪出願人 ディナーフアーバー ニャンサ
ー インスティチュート イン
コーポレイテッド
アメリカ合衆国、マサチューセツツ 02115、ボストン、
ストリート 44

⑫出願人 ウォルター, パーバラ ピー
アメリカ合衆国、マサチューセツツ 02139、ケンブリッ
バー ストリート 7

⑬出願人 スプリンガー, テイモシー エ
イ
アメリカ合衆国、マサチューセツツ 02167、ニュートン
ノック コード 28

⑭出願人 ヘンション, キヤサリン
アメリカ合衆国、マサチューセツツ 02190、サウス ウ
ス、6、ファンティン レーン 98

⑮出願人 ティザード, リチャード
アメリカ合衆国、マサチューセツツ 02139、ケンブリッ
バー テー-3、ハーバード ストリート 334

⑯出願人 マグリアノ, ロバート
アメリカ合衆国、マサチューセツツ 02158、ニュートン
ト サイド パークウエイ 114

⑰出願人 ダステイン, マイケル エル
アメリカ合衆国、マサチューセツツ 02215、ボストン、
メント 23、パーク ドライブ 231